体外診断用医薬品
製品番号 6607053

**2009 年 11 月改訂
*2007 年 2 月改訂
承認番号 21600AMY00089000

日本標準商品分類番
877449

* T 細胞サブセットキット
サイトスタット triCHROME
CD8-FITC/CD4-RD1/CD3-PC5

ご使用に際しては、本添付文書をよくお読みください。

全般的な注意

1. 本品は、体外診断用でありそれ以外の目的に使用しないでください。
2. 診断は他の関連する検査結果や臨床症状等に基づいて総合的に判断してください。
3. 添付文書等に記載した内容以外の方法で使用した場合には、保証しません。
4. ご使用にあたっては、測定装置の取扱説明書をよく読んでから使用してください。

形状・構造等(キットの構成)

構成試薬名　　成分　　　　　分量(1 回測定分)

モノクローナル抗体試薬

フルオレセインイソチオシアネート結合
抗ヒト CD8 マウスモノクローナル抗体:　0.18μg

フィコエリスリン結合
抗ヒト CD4 マウスモノクローナル抗体:　0.18μg

フィコエリスリンサイアニンファイブ結合
抗ヒト CD3 マウスモノクローナル抗体:　0.31μg

*) フルオレセインイソチオチアネート:FITC と略記
フィコエリスリン:RD1 と略記
フィコエリスリンサイアニンファイブ:PC5 と略記

クローン:

CD3: UCHT1
セザリー病患者から得られた末梢血リンパ球と胸腺細胞で免疫したBALB/c マウスの脾臓細胞とNS-1 マウス骨髄腫細胞の融合細胞から分離

CD4: SCFI12T4D11 (T4)
ヒト末梢血 T 細胞で免疫した BALB/cJ マウスの脾臓細胞と NS-1 マウス骨髄腫細胞の融合細胞から分離

CD8: SCFI21ThyD3 (T8)
ヒト末梢血 T 細胞で免疫した BALB/cJ マウスの脾臓細胞と NS-1 マウス骨髄腫細胞の融合細胞から分離

Ig 構造:
マウス IgG1-H 鎖及びκ-L 鎖(CD3、CD4、CD8)

細胞毒性:
なし(CD3、CD4、CD8)

原料及び精製法:
融合細胞の培養上清よりアフィニティクロマトグラフィで精製(CD3、CD4、CD8)

標　識:
CD8-FITC　ー　Fluorescein isothyocyanate (FITC)
CD4-RD1　ー　Phycoerythrin (PE)
CD3-PC5　ー　Phycoerythrin-Cy5 (PC5)

色素/抗体モル比:
FITC/抗体タンパク比　＝ 3～10
RD1/抗体タンパク比　＝ 0.5～1.5
PC5/抗体タンパク比　＝ 0.5～1.5

蛍　光:
FITC(緑)　:励起波長 468～509nm、蛍光波長 504～541nm
RD1(オレンジ):励起波長 486～580nm、蛍光波長 568～590nm
PC5(深赤)　:励起波長 486～580nm、蛍光波長 660～680nm

試薬の組成:
抗体タンパク以外の成分として、ウシ血清アルブミン(BSA)0.2%、リン酸カリウム 0.01M、塩化ナトリウム 0.15M、アジ化ナトリウム 0.1%及び安定剤を含みます。

使用目的

全血中のリンパ球細胞表面抗原の分析及び成熟 T 細胞とヘルパー/インデューサーT 細胞、サプレッサー/細胞障害性 T 細胞の測定

サイトスタット triCHROME CD8-FITC/CD4-RD1/CD3-PC5 モノクローナル抗体試薬は、3 種類のマウスモノクローナル抗体で構成される3カラー蛍光試薬で、各々の抗体は異なる蛍光色素で標識されています。

この試薬を用いて、フローサイトメトリーで全血中の CD3 陽性、CD4 陽性、CD8 陽性、CD3 陽性かつ CD4 陽性ダブルポジティブ、CD3 陽性か CD8 陽性ダブルポジティブリンパ球の同定とそれらの陽性率及び絶対数の測定を同時に行うことができます。

測定原理

この分析方法は、細胞表面に発現する特定の抗原決定基に対するモノクローナル抗体の結合によります。全血にモノクローナル抗体試薬を添加して、細胞を特異的に染色します。サイトスタット triCHROME CD8-FITC/CD4-RD1/CD3-PC5 モノクローナル抗体試薬では、特定の蛍光色素を結合した、それぞれ異なる細胞表面抗原に特異的な 3 種類のマウスモノクローナル抗体を組み合わせています。

別に Cyto-Stat/COULTER CLONE Mo2-RD1/KC56-FITC で染色した全血サンプルを用いて、リンパ球ゲートの純度と回収率を評価します。さらにサイトスタット triCHROME SIgG1-FITC/MSIgG1-RD1/MsIgG1-PC5 アイソタイプコントロール抗体試薬で染色した全血サンプルで、非特異反応のモニタリングを行います。

赤血球を COULTER IMMUNOPREP™ Reagent System と Q-Prep™、Multi-Q-Prep™、または TQ-Prep™ワークステーションで溶血して、残存する血液細胞をリンパ球にゲートを設定したフローサイトメトリーで分析します。最初のヒストグラムで、前方散乱光(FS)、側方散乱光 (SS)とも低い領域にリンパ球ゲートを設定します。

次のヒストグラムでは、4 分割リージョンで CD3 陰性 CD4 陽性(RD1 蛍光のみ陽性)、CD3 陽性 CD4 陽性(PC5、RD1 蛍光とも陽性)、CD3陽性 CD4 陰性(PC5 蛍光のみ陽性)、CD3 陰性 CD4 陰性(PC5、RD1 蛍光とも陰性)の各細胞の割合をそれぞれ求めます。3番目のヒストグラムでは、4分割リージョンで CD3 陰性 CD8 陽性(FITC 蛍光のみ陽性)、CD3 陽性 CD8 陽性(PC5、FITC 蛍光とも陽性)、CD3 陽性 CD8 陰性(PC5 蛍光のみ陽性)、CD3 陰性 CD8 陰性(PC5、FITC 蛍光とも陰性)の各細胞の割合をそれぞれ求めます。

操作上の注意

1. 最適な結果を得るには、検体は採取後 6 時間以内に染色してください。染色するまでの間、検体は採血管のまま室温保存してください。検体を冷蔵しないでください。冷蔵保存により結果に異常をきたすおそれがあります。
2. 精度の低下を最小限にするため、染色後のサンプルは速やかに測定してください。
3. 静脈血検体の血球生存率は 90%以上が適当ですが、一部の異常検体では、これを下回ることがあります。
4. 血球を長時間溶血試薬にさらすと、白血球が破壊され、目的とする細胞が失われるおそれがあります。
5. 有核赤血球、タンパク濃度異常、異常ヘモグロビン症などでは、赤血球の溶血が不完全になる場合があります。この場合、溶血しなかった赤血球が白血球として計測されるため、測定結果が誤って低くなるおそれがあります。
6. この試薬は全血検体用に調製されています。この試薬は、

Cyto-Trol コントロール細胞にも使用できます。新鮮または凍結保存した単核細胞検体への使用はお勧めできません。
7. 試薬を希釈、小分け分注、もしくは凍結保存しないでください。試薬はそのままでご使用ください。
8. この試薬はフローサイトメトリー専用です。
9. 健康状態の異常が常に特定の白血球集団の陽性率異常となって現れるとは限りません。健康状態が異常でも、健常者と同程度の陽性率を示す場合があります。分析結果は臨床所見や他の検査データと合わせてご使用ください。
10. 一部の患者検体では、特定の細胞集団の細胞数が変動もしくは低下することによる問題が生じる場合があります。
11. OKT3 治療を受けている患者は、サイトスタット triCHROME CD8-FITC/CD4-RD1/CD3-PC5 モノクローナル抗体試薬では適切な評価ができない場合があります。
12. レーザー光軸の調整不良やゲートの設定が適切でない場合、フローサイトメトリーで得られる結果は不正確となります。
13. リンパ球絶対数の測定において、分析方法の違いによって許容範囲を超える施設間差がみられるため、用いる測定方法の正確性の評価が必要です。

用法・用量（操作方法）

【試薬の調製】

調製の必要はありません。サイトスタット triCHROME モノクローナル抗体試薬は、バイアルから直接使用します（10μL/テスト）。試薬は20～25℃に戻してからご使用ください。

【検体の採取と調製】

注意事項：
血液検体の安定性は検体により異なります。最適な結果を得るには、採血後 6 時間以内に検査を始めてください。未染色の血液検体は調製を開始するまで 20～25℃で保存してください。検体を冷蔵しないでください。

適当な抗凝固剤（EDTA 推奨）を用いた採血管に静脈穿刺で血液検体を採取します。1 テストあたり 100μL の全血が必要です。テスト及び各コントロールの測定と検体希釈が必要な場合の希釈用自己血漿を採取するのに十分な量の血液（1～2mL）を採取します。各施設で用いている方法によって、各検体の白血球数と生残率を測定します。推奨される生残率は 90%以上ですが、検体によってはそれ以下となる場合があります。

[サイトスタット triCHROME モノクローナル抗体試薬による細胞表面染色]

【試 薬】

サイトスタット triCHROME CD8-FITC/CD4-RD1/CD3-PC5
製品番号 6607053： 50 テスト（0.5mL）

【その他に必要な試薬等】

- 赤血球溶血試薬（適当なものを選択）：
  COULTER Q-PREP ワークステーション用 COULTER IMMUNOPREP 試薬システム
  製品番号 7546946： 100 テスト
  または、
  COULTER MULTI-Q-PREP または TQ-PREP ワークステーション用 COULTER IMMUNOPREP 試薬システム
  製品番号 7546999： 300 テスト
- 検体希釈用の自己血漿（必要に応じて）
- アイソタイプコントロール試薬
  サイトスタット triCHROME MSIgG1-FITC/MSIgG1-RD1/MSIgG1-PC5
  製品番号 6607054： 50 テスト
- リンパ球ゲーティング試薬
  Cyto-Stat/COULTER CLONE Mo2-RD1/KC56-FITC
  製品番号 6603909： 50 テスト
- オプション試薬
  FLOW-COUNT 蛍光粒子： 製品番号 7547053（20 mL）
  CYTO-COMP™ Reagent Kit： 製品番号 6607021（4×0.5 mL）
  CYTO-COMP Cell Kit： 製品番号 6607023（5×1 mL）
- 12×75 mm 試験管
- 抗凝固剤（EDTA 推奨）入り真空採血管
- ホールピペット
- パスツール ピペット
- マイクロピペッター
- ボルテックスミキサー
- フローサイトメーター（CYTOMICS FC500、EPICS XL/XL-MCL または相当品）
- 血球アナライザー（コールターLH700 シリーズまたは相当品）または血球算定板
- 綿棒

【染色操作】

1. 染色に最適な白血球数の範囲は 3～10×10^3個/μL です。白血球数が 10×10^3 個/μL を超える場合は検体を希釈します。3×10^3個/μL より少ない場合は遠心濃縮します。
   Q-PREP/IMMUNOPREP 試薬システムを用いて赤血球を溶血する場合には、同一患者の血漿で検体を希釈してください。

   白血球数が異常な検体の細胞数調整
   a）白血球数が多い検体の場合（＞10×10^3個/μL）

白血球数		希釈倍率
10～20	×10^3	1：2
20～30	×10^3	1：3
30～40	×10^3	1：5
40～60	×10^3	1：6
60～100	×10^3	1：10
100～200	×10^3	1：20

   b）白血球数が少ない検体の場合（＜3×10^3個/μL）

   バフィーコート法
   （1）検体を 25℃で 500×g、5 分間遠心します。
   （2）白血球の層をピペットで採取します。白血球全部を確実に回収するため赤血球と血漿も一部を回収してください。
   （3）数回ピペッティングして、十分に懸濁させます。
   （4）コールターLH700 シリーズ等のヘマトロジーアナライザーか血球計算板を用いて細胞濃度を測定します。
   （4）自己血漿で細胞濃度を 10×10^3個/μL に調整します。

2. 12mmφ×75mm の試験管をテスト用、アイソタイプコントロール用、リンパ球ゲーティング用に 3 本用意し、対応する試験管に、それぞれサイトスタット triCHROME CD8-FITC/CD4-RD1/CD3-PC5、サイトスタット triCHROME MSIgG1-FITC/MSIgG1-RD1/MSIgG1-PC5、Cyto-Stat/COULTER CLONE Mo2-RD1/KC56-FITC を 10μL 分注します。
3. 試験管に全血を 100μL ずつ分注します。溶血不良を避けるため、血液を試験管の上部側面に付けないように注意してください。
4. よく撹拌した後、室温で 10～12 分間反応させます。

   重要： 未溶血の赤血球が調製後のサンプルに混入して誤差を生じるおそれがあるため、血液飛沫が試験管上部に残っている場合は、必ず取り除いてください。付着した血液飛沫は、綿棒で取り除くことができます。

5. TQ-Prep、Multi-Q-Prep または Q-Prep のいずれかを用いて赤血球を溶血処理します。
6. 調製したサンプルをマルチカラー測定可能なフローサイトメーターで測定します。用いるフローサイトメーターは正しく調整し、サンプル測定手順の項にしたがって適切にリンパ球領域にゲーティングします。良好な結果を得るために、調製後は速やかに測定してください。
   a. フローサイトメーターの蛍光パラメータの取得はログスケールで行ってください。
   b. 前方散乱光（FS）と側方散乱光（SS）の取得はリニアスケールで行ってください。

【精度管理手順】

フローサイトメーターは、機器の取扱説明書に記載されている手順に従って正しく調整し、散乱光及び蛍光の感度設定を標準化してください 。

Fluorescein isothyocyanate（FITC）、Phycoerythrin（PE）、Phycoerythrin-Cy5（PC5）の各蛍光色素は、それぞれ異なる波長の蛍光を発しますが、蛍光スペクトルの一部が重なっており、その分を電気的に補正しなければなりません。

蛍光補正（コンペンセーション）は、各々の蛍光色素で標識したモノクローナル抗体試薬で染色したサンプルを 2 パラメータ蛍光ヒストグラム上で分析することにより最適化できます。また、CYTO-COMP 試薬

キットで染色したCYTO-COMP Cellでも最適化できます。いずれの方法とも、各蛍光色素の陽性細胞が各々の 4 分割リージョンの Quadrant2 に入らないように調整します。サイトスタット triCHROME CD8-FITC/CD4-RD1/CD3-PC5 で染色した COULTER CYTO-TROL コントロール細胞で蛍光補正が適切かどうかを確認できます。

サンプルを分析する前に、陽性率既知のコントロール検体（例えば、COULTER CYTO-TROL コントロール細胞等）を染色して、抗体の反応性を確認してください。

抗体の Fc 部分の単球や顆粒球への特異的もしくは非特異的な結合は、フローサイトメーターのリンパ球ゲートを適切に設定することにより排除できます。リンパ球ゲーティング用 CD45/CD14 モノクローナル抗体試薬（Cyto-Stat/COULTER CLONE Mo2-RD1/KC56-FITC）を測定して、単球を含まない正しいリンパ球ゲートを設定します。

サイトスタット triCHROME MSIgG1-FITC/MSIgG1-RD1/MSIgG1-PC5 アイソタイプコントロールを用いて、リンパ球における非特異的な Fc 結合を確認した上でカーソル位置を設定します。カーソルは、Quadrant-3 がおおむね 98%以上となる位置を目安に設定します。Quadrant-1、2、4 の非特異的蛍光は、正常検体では通常 2%以内です（2%を超えた場合は結果に誤差が含まれるおそれがあります）が、腫瘍細胞検体ではこれより強い非特異的蛍光を示すことがあります。

【サンプル測定手順】

注意: フローサイトメーターのレーザー光軸の調整不良、フィルタ選択が不適切な場合、またはゲートが正しく設定されていない場合、測定結果が不正確になることがあります。

1. リンパ球ゲーティング用のサンプルを測定し、SS（90° LS）とFSの2パラメータヒストグラムを取得します。白血球の3パート分画パターンが得られます。FS、SS ともに低いリンパ球の周囲にゲートを設定します（図1参照）。ゲート内リンパ球の純度と回収率を確認し、必要があれば、さらにリンパ球ゲートを最適化します（詳細は、Cyto-Stat/COULTER CLONE Mo2-RD1/KC56-FITC の製品添付説明書を参照してください）。

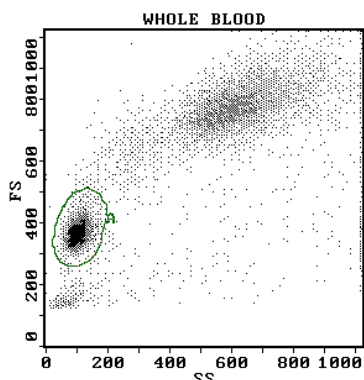
図 1　SS/FS の 2 パラメータヒストグラムにおけるリンパ球ゲート（Gate A）の設定例

2. アイソタイプコントロール用のサンプルを測定し、リンパ球にゲーティングした MsIgG1-PC5（FL3 Log または FL4 Log）と MsIgG1-RD1（FL2 Log）の 2 パラメータヒストグラムを取得します（図 2 参照）。アイソタイプコントロールの Quadlant-3 が 98%以上となる位置を目安に、4 分割リージョンを設定します。同様に、リンパ球にゲーティングした MsIgG1-PC5（FL3 Log または FL4 Log）と MsIgG1-FITC（FL1 Log）の 2 パラメータヒストグラムを取得します（図 3 参照）。アイソタイプコントロールの Quadlant-3 が 98%以上となる位置を目安に、4 分割リージョンを設定します。

図 2　リンパ球にゲーティングした MsIgG1-PC5 と MsIgG1-RD1 の 2 パラメータヒストグラムにおける 4 分割リージョン設定例

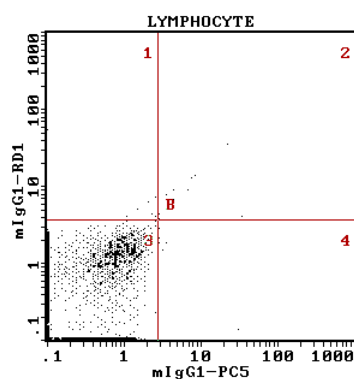



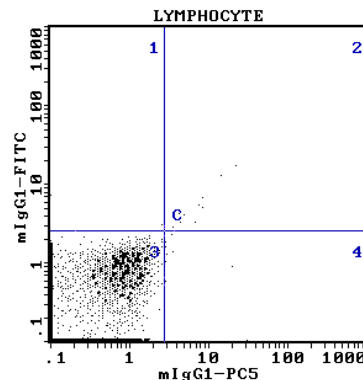
図 3　リンパ球にゲーティングした MsIgG1-PC5 と MsIgG1-FITC の 2 パラメータヒストグラムにおける 4 分割リージョン設定例

3. テスト用のサンプルを測定し、アイソタイプコントロールで設定した 4 分割リージョンを用いて、リンパ球にゲーティングした CD3-PC5（FL4 Log または FL3 Log）と CD4-RD1（FL2 Log）、及び CD3-PC5（FL4 Log または FL3 Log）と CD8-FITC（FL1 Log）の 2 パラメータヒストグラムを解析します。（図 4 及び図 5 参照）

図 4　リンパ球にゲーティングし、アイソタイプコントロールで 4 分割リージョンを設定した CD3-PC5／CD4-RD1 の 2 パラメータヒストグラム例

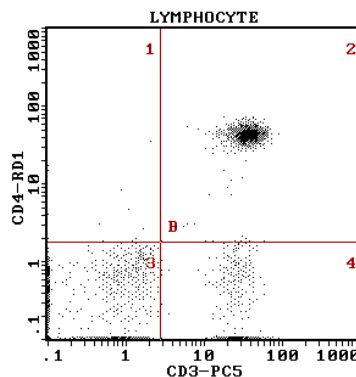
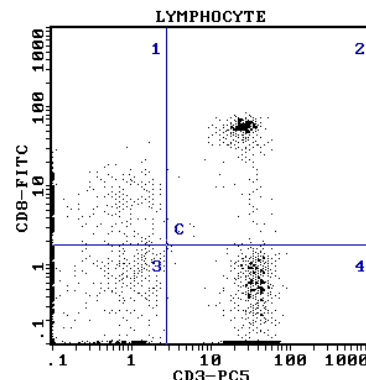



図 5: リンパ球にゲーティングし、アイソタイプコントロールで 4 分割リージョンを設定した CD3-PC5／CD8-FITC の 2 パラメータヒストグラム例

【絶対数の測定】

絶対数の測定には、以下の 2 方法があります。

（1）絶対数測定の標準（間接）法： 血球計数とフローサイトメトリーの結果を組み合わせたもので、以下の式を使用します。

絶対数（細胞/μL）

＝ 全白血球数（細胞/μL）×% リンパ球比率×% 陽性率／10^4

（2）FLOW-COUNT 法（直接法）：FLOW-COUNT 蛍光粒子を使用して絶対数を直接測定します。以下の式を使用します。

絶対数（細胞/μL）

＝（測定した対象細胞数／測定した FLOW-COUNT 蛍光粒子数）×FLOW-COUNT 蛍光粒子アッセイ濃度

測定結果の判定方法

【期待値（正常参考値）】

自社施設にて、18〜85 歳の健常者男女（n=56）の末梢血をサイトスタット triCHROME CD8-FITC/CD4-RD1/CD3-PC5 で染色しました。検体は米国中西部にて人種の区別なしに集めました。フローサイトメトリー（EPICS XL-MCL）でリンパ球にゲーティングして測定した CD3+、CD4+、CD8+、CD3+/CD4+、CD3+/CD8+それぞれの陽性率及び陽性細胞の絶対数は以下の通りです。絶対数は標準法（間接法）で測定しています。数値は、リンパ球ゲート中のリンパ球純度で補正し（許容限界：純度 90％以上、回収率 85％以上）、全リンパ球に対する割合（陽性率）及び絶対数（細胞／μL）で表しています。

これらは正常参考値の一例です。正常参考値は施設ごとに各地域の正常検体を用いて設定してください。

	正常全血検体			
	n	Min	Max	Mean±1SD
リンパ球中の陽性率（%）				
CD3+	56	66	93	79.7±6.1
CD4+	56	39	76	54.2±7.7
CD8+	56	16	43	28.0±6.1
CD3+/CD4+	56	38	75	53.5±7.7
CD3+/CD8+	56	10	40	24.2±6.0

	正常全血検体			
	n	Min	Max	Mean±1SD
陽性細胞の絶対数（細胞/μL）				
CD3+	56	769	2,045	1,431±332
CD4+	56	437	1,627	969±239
CD8+	56	236	895	502±159
CD3+/CD4+	56	431	1,618	957±239
CD3+/CD8+	56	163	789	437±150

臨床的意義

ヒト末梢血のリンパ球は、T 細胞（胸腺由来）、B 細胞（骨髄由来）、NK 細胞（ナチュラルキラー細胞、null 細胞）の 3 つの細胞集団で構成されています。これらの細胞型は、顕微鏡検査では形態学的に区別できませんが、細胞膜上の固有な抗原の違いによって同定が可能です。

T 細胞及び B 細胞は免疫機能の中心的役割を果たしています。種々の T 細胞サブセットが特異的抗原を認識して、エフェクター機能を発揮し、細胞性／体液性免疫応答を調節しています。抗原やマクロファージによる活性化の過程で、T 細胞を介して抗原特異的な B 細胞が抗原特異的な免疫グロブリン（Ig）を産生・分泌する形質細胞へと分化します。

歴史的に、T 細胞と B 細胞は、それぞれヒツジ赤血球に対するレセプタ（E-ロゼット・レセプタ）と細胞表面免疫グロブリン（SmIg）により同定されていました。E-ロゼット法は、T 細胞に特異的であるものの、光学顕微鏡下でヒツジ赤血球と T 細胞の結合を観察し細胞数を数えねばなりません。SmIg の測定による B 細胞の同定・定量も、他の細胞集団で Ig-Fc 部分に対するレセプタに結合した Ig による SmIg 偽陽性がみられるため、精度に限界があります。

その後、T、B、NK 細胞とそれらの亜分画を同定するためのモノクローナル抗体が開発されました。従来の比較的特異性の低いポリクローナル抗体（異種抗血清）に比べ、モノクローナル抗体は各々が異なる表面抗原を特異的に認識します。これにより、正確で確実なリンパ球測定だけでなく、他の細胞マーカー（TdT、HLA-DR 関連抗原、SmIg）と組み合せて、T 細胞及び B 細胞分化段階の同定も行うことができます。

細胞表面抗原は、細胞の成熟（分化）段階や機能を反映する形で、T 細胞、B 細胞上に発現あるいは消失します。特定の細胞に発現する表面抗原は 1 種類のみではなく、他にも成熟段階の一時期あるいは全期間にわたって発現する表面抗原が存在します。

T 細胞における“Pan-T 細胞”抗原は、CD7（初期前胸腺細胞）；CD2；CD5（未熟胸腺細胞）；細胞質内 CD3（未熟及び中間型胸腺細胞）；細胞表面 CD3（成熟胸腺細胞）というような順序で発現していきます。これに伴って、CD4 と CD8 の同時発現（中間型胸腺細胞）とそれに引き続くどちらか一方のみの発現（成熟胸腺細胞）がみられます。これらの表面抗原は、末梢血やリンパ組織中の休止期及び活性化 T 細胞に至るまで、成熟段階を通してその発現が継続します。

B 細胞における“Pan-B 細胞”抗原は、CD19（B 前駆細胞／pre-pre-B 細胞）；CD20（pre-B 細胞）という順序で発現していきます。CD19、CD20 ともに、休止期及び活性化 B 細胞やリンパ組織 B 細胞を含む成熟 B 細胞の分化段階まで発現が継続します。どちらも B 細胞分化の最終段階である形質細胞で消失します。

“Pan-T 細胞”抗原や“Pan-B 細胞”抗原に特異的なモノクローナル抗体は、それぞれ成熟 T 細胞及び B 細胞の同定・定量に用いることができます。また、リンパ球の成熟（分化）段階や機能的分類は、特定の細胞表面抗原に特異的なモノクローナル抗体を用いて確定することができます。本品は、末梢血中の“Pan-T 細胞”及び“インデューサーT 細胞”、“サプレッサー／細胞障害性 T 細胞”の表面抗原である CD3、CD4、CD8 のそれぞれに特異的に結合するモノクローナル抗体によって、末梢血中の T 細胞及びそのサブセットを測定します。本品は、同じ全血サンプル中の異なる T リンパ球集団を一度に分析することができます。

CD3（分子量 20kD）
CD3 抗体は、T 細胞レセプタと複合体を形成している CD3 抗原分子鎖のうちの ε 鎖を認識しています。この抗原は、系統特異的な“Pan-T 細胞”表面抗原で、成熟胸腺細胞と末梢血の休止期及び活性化 T 細胞（インデューサー及びサプレッサー／細胞障害の両方のサブセットを含む）に発現しています。

CD4（分子量 62kD）
CD4 は、胸腺細胞の一部と末梢血のインデューサーT 細胞亜群、及び単球に発現しています。単球にも低密度で発現しています。CD4 陽性リンパ球は、免疫応答において中心的な役割を果たしており、末梢血では、CD4 陽性リンパ球は、T 細胞と T 細胞、T 細胞と B 細胞、T 細胞とマクロファージの各々の相互作用でインデューサー機能をつかさどっています。CD4 抗原分子は、標的細胞上の class-Ⅱ主要組織適合遺伝子複合体（MHC）抗原分子に結合します。

CD8（分子量 68kD ＝ 32-34kD のジスルフィドダイマ）
CD8 抗原は、胸腺細胞の約 80%と末梢血のT細胞の約 30〜35%、及び NK 細胞の一部に発現しています。CD8 陽性リンパ球は、そのサプレッサー機能及び細胞障害機能を通じて、免疫応答において中心的な役割を果たしています。CD8 抗原分子は、標的細胞上の class-Ⅰ主要組織適合遺伝子複合体（MHC）抗原分子に結合します。

CD3 陽性、CD4 陽性、もしくは CD8 陽性リンパ球の割合（陽性率）と陽性細胞数（絶対数）は、既知あるいは未知の疾病下にある患者の免疫機能の評価や、臓器移植後のリンパ球レベルのモニタに有用です。

すなわち、CD3 陽性、CD4 陽性、もしくは CD8 陽性リンパ球数の異常は、白血球数の減少をきたす疾患の診断及び予後判定に役立ちます。CD3 陽性、CD4 陽性もしくは CD8 陽性リンパ球の変動が 腎、心、肝、肺などの臓器移植に伴って認められ、これらの細胞集団のモニタリングが有用であることが示唆されています。

CD4 陽性リンパ球数の異常を確認することは、免疫不全症の診断や予後判定にも有用です。例えば、後天性免疫不全症候群（AIDS）の病原体である ヒト免疫不全ウィルス（HIV）に感染すると、HIV のレセプタ（CD4 抗原分子そのもの）を発現している CD4 陽性リンパ球が選択的に死滅することにより免疫抑制が起こります。臨床上、免疫学上の異常の進行は、一般に CD4 陽性リンパ球数の減少と相関しています。

T4/T8 比
疾病に関連した CD4 もしくは CD8 陽性リンパ球数の変化は、CD4/CD8（T4/T8）比、すなわちインデューサーT 細胞とサプレッサー／細胞障害性 T 細胞の比の変化をもたらします。したがって、T4/T8 比は診断及び免疫機能の予後指標として有用です。

T4/T8 比及び CD4 陽性リンパ球数は、ARC（AIDS-related complex）及び AIDS の判定に最も広く用いられている検査項目です。進行した AIDS 患者では、CD4 陽性リンパ球数が検出限界未満になるとともに、T4/T8 比が0（ゼロ）に近づきます。このような症例では、CD8 陽性リンパ球数は正常、増加、あるいは減少と様々です。

T4/T8 比に有意な変動を来さない程度の CD4 陽性リンパ球の陽性率減少と CD8 陽性リンパ球の陽性率増加が、腎移植後の腎機能が安定している時期の患者で観察されています。また、自家骨髄移植後の造血系再構築の過程で、T4/T8 比と CD4 陽性リンパ球の陽性率低下が認められています。

性能

【特異性】

CD3 抗原は、通常、成熟胸腺細胞と休止期及び活性化した末梢血成熟 T リンパ球（インデューサーとサプレッサー／細胞障害性サブセットの両方）の細胞表面にみられます。

CD4 抗原は、成熟胸腺細胞及び末梢血中のインデューサーT リンパ球サブセットにみられます。また単球にも低密度に発現します。

CD8 抗原は、通常、胸腺細胞の約 80%、末梢血 T リンパ球の 30〜35%、及び一部の NK 細胞にみられます。

交差反応性について評価するため、サイトスタット triCHROME CD8-FITC/CD4-RD1/CD3-PC5 モノクローナル抗体試薬を、複数の健常成人供血者の血液検体でスクリーニングしました。その結果、CD3、CD4、CD8 の各モノクローナル抗体は、それぞれ対応するリンパ球集団に特異的に反応することが示されました。単球は、CD4 モノクローナル抗体でわずかに染色されました。

抗体試薬の非特異的な反応を管理するための手法については、精度管理手順の項を参照してください。

【同時再現性】

自社施設にて、CD3、CD4、CD8 陽性率の異なる健常者末梢血検体をEPICS XL-MCLフローサイトメーターで10回測定して得られた陽性率及び変動係数（%CV）は以下のとおりです。検体には、モノクローナル抗体結合磁気ビーズを用いてCD4陽性細胞及びCD8陽性細胞の割合をそれぞれ調節した正常全血を用い、サイトスタット triCHROME CD8-FITC/CD4-RD1/CD3-PC5 で染色しました。リンパ球中の陽性率を以下に示します。

		CD3 陽性率（%）		CD4 陽性率（%）		CD8 陽性率（%）	
濃度	n	Mean±1SD	%CV	Mean±1SD	%CV	Mean±1SD	%CV
低値	10	45.5±0.66	1.46	10.9±0.53	4.84	11.0±0.35	3.16
正常	10	77.9±1.49	1.91	57.7±1.14	1.97	27.4±0.81	2.94
高値	10	86.0±0.65	0.75	74.7±0.52	0.70	64.2±0.34	0.52

【施設間差】

自社内の異なるフローサイトメーター（EPICS XL/XL-MCL）を使用している3施設で、同じ日に同一健常者の末梢血検体を 10 回測定しました。健常者 1 名から採取した全血検体を 3 分割し、それぞれの施設でサイトスタット triCHROME CD8-FITC/CD4-RD1/CD3-PC5 で染色しました。リンパ球中の陽性率を以下に示します。

		CD3 陽性率（%）		CD4 陽性率（%）		CD8 陽性率（%）	
施設	n	Mean±1SD	%CV	Mean±1SD	%CV	Mean±1SD	%CV
1	10	72.6±0.56	0.77	52.3±0.50	0.97	20.9±0.61	2.90
2	10	73.3±0.71	0.97	53.1±0.56	1.06	20.8±0.46	2.22
3	10	73.4±0.56	0.76	53.1±0.66	1.24	21.1±0.62	2.94

【既承認品との相関性】

サイトスタット triCHROME CD8-FITC/CD4-RD1/CD3-PC5 と自社既承認品*の相関性を検討するため、全血検体（n=50）をフローサイトメトリーで分析しました（EPICS XL-MCL 使用、リンパ球にゲーティング）。

以下に示すように、リンパ球中の CD3、CD4、CD8 のいずれにおいても良好な相関性が得られています。

*自社既承認品：

サイトスタット/コールタークローン CD3（IgG1）-FITC/T4-RD1
（CD3 陽性率及び CD3+/CD4+陽性率における相関性）

サイトスタット/コールタークローン CD3（IgG1）-FITC/T8-RD1
（CD3 陽性率及び CD3+/CD8+陽性率における相関性）

CD3 陽性率（平均値）	y＝ 1.01x －0.68	r＝ 0.992
CD3+/CD4+陽性率	y＝ 0.98x ＋3.06	r＝ 0.962
CD3+/CD8+陽性率	y＝ 0.92x ＋1.95	r＝ 0.970

使用上または取扱上の注意

1. この試薬はアジ化ナトリウムを 0.1%含みます。アジ化ナトリウムは、酸性条件下で非常に毒性の強いヒドラジン酸を発生します。このため、アジ化物は水を大量に流しながら廃棄してください。これにより金属製配水管内への爆発性堆積物の蓄積を防ぐことができます。
2. 検体、サンプル、及びこれらに接触したものはすべて感染性があるものとして取り扱い、注意事項を順守して廃棄してください。
3. 口でサンプルをピペッティングしないでください。また、皮膚や粘膜に触れないようにしてください。
4. バイアルのラベルに表示された有効期限を過ぎた試薬は使わないでください。
5. 保管時及び使用時に、できるだけ試薬を光に当てないようにしてください。
6. 試薬が微生物に汚染されないように注意してください。汚染された試薬では誤った結果が出るおそれがあります。
7. この試薬を取り扱う際には、GLP（Good Laboratory Practices）を実践してください。
8. 飲み込むと有害です。
9. 皮膚や眼に触れた場合は、直ちに大量の水で洗ってください。
10. 試薬の物性・外観（正常な外観は透明なピンク色の液体）に変化がみられる場合、コントロールサンプルの測定値に大幅な変動がみられる場合は、製品が劣化している可能性があるため使用しないでください。

貯法、有効期限、安定性

サイトスタット triCHROME CD8-FITC/CD4-RD1/CD3-PC5 ：

2～8℃保存　　製造後 12 箇月

未開栓の試薬は、2～8℃で保存すればバイアルのラベルに表示された有効期限まで使用できます。

バイアル開栓後は、2～8℃で保存した場合 90 日間安定です。使用後は速やかに 2～8℃に戻してください。

凍結させないでください。できるだけ光に当てないようにしてください。

包装単位

サイトスタット triCHROME CD8-FITC/CD4-RD1/CD3-PC5

製品番号 6607053：　容量 50 テスト（0.5mL）

RD1：米国特許 4,520,110
PC5：米国特許 4,520,110 及び 4,542,104
Cy5：米国特許 4,981,977 及び 5,268,486

主要文献

1. Schlossman SF, Boumsell L, Gilks W, Harlan JM, Kishimoto T, Morimoto C, Ritz J, Shaw S, Silverstein R, Springer R, Tedder TF and Todd RF, eds. 1995. Leukocyte Typing V. Oxford, UK: Oxford University Press, pp. 262, 263, 268.
2. Bernard A, Boumsell L, Dausset J, Milstein C and Schlossman SF, eds. 1984. Leukocyte Typing. New York, NY:Springer-Verlag, pp. 28, 41-42, 44, 196.
3. McMichael AJ, ed. 1987. Leukocyte Typing III. Oxford, UK: Oxford University Press, pp. 38, 40, 42, 43, 116, 167, 170-172, 176, 199, 206, 302-308, 315, 475.
4. Reinherz EL and Schlossman SF. 1980. The differentiation and function of human T lymphocytes. Cell 19:821-827.
5. Aiuta F, Cerottini J-C, Coombs RRA, Cooper M, Dickler HB, Froland Fudenberg HH, Greaves MF, Grey HM, Kunkel HG, Natvig J, Preud'homme J-L, Rabellino E, Ritts RE, Rowe DS, Seligmann M, Siegal FP, Stjernsward J, Terry WD and Wybran J. 1975. Identification, enumeration and isolation of B and T lymphocytes from human peripheral blood. International Union of Immunological Societies（IUIS）, Report – July 1974. Clin Immunol and Immunopathol 3:584-597.
6. Foon KA and Todd RF. 1986. Immunologic classification of leukemia and lymphoma. Blood 68:1-31.
7. Drexler HG, Gignac SM and Minowada J. 1988. Routine immunophenotyping of acute leukaemias. Blut 57:327-339.
8. Reinherz EL, Haynes BF, Nadler LM and Bernstein ID. 1986. Leukocyte Typing II. New York, NY: Springer-Verlag, Vol 2: pp. 8, 15-25.
9. Barclay AN, Birkeland ML, Brown MH, Beyers AD, Davis SJ, Somoza Williams AF eds. 1993. The Leukocyte Antigen Facts Book. London, UK: Academic Press, pp.106-109.
10. Reinherz EL, Meuer S, Fitzgerald KA, Hussey RE, Levine H and Schlossman SF. 1982. Antigen recognition by human T lymphocytes is linked to surface expression of the T3 molecular complex. Cell 30:735-743.
11. Meuer SC, Acuto O, Hussey RE, Hodgdon JC, Fitzgerald KA, Schlossman SF and Reinherz EL. 1983. Evidence for the T3-associated 90K heterodimer as the T-cell antigen receptor. Nature 303:808-810.
12. Reinherz EL, Meuer SC and Schlossman SF. 1983. The delineation of antigen receptors on human T lymphocytes. Immunol Today 4:5-8.
13. Reinherz EL, Morimoto C, Fitzgerald KA, Hussey RE, Daley JF and Schlossman SF. 1982. Heterogeneity of human T4+ inducer T cells defined by a monoclonal antibody that delineates two functional subpopulations. J Immunol 128:463-468.
14. de Martini RM and Parker JW. 1989. Immunologic alterations in human immunodeficiency virus infection: A review. J Clin Lab Anal 3:56-70.

15. Morimoto C, Letvin NL, Distaso JA, Aldrich WR and Schlossman SF. 1985. The isolation and characterization of the human suppressor inducer T cell subset. J Immunol 134:1508-1515.
16.. Morimoto C, Letvin NL, Distaso JA, Brown HM and Schlossman SF. 1986. The cellular basis for the induction of antigen-specific T8-suppressor cells. Eur J Immunol 16:198-204.
17. Meuer SC, Schlossman SF and Reinherz EL. 1982. Clonal analysis of human cytotoxic T lymphocytes: T4+ and T8+ effector T cells recognize products of different major histocompatibility regions. Proc Natl Acad Sci USA 79:4395-4399.
18. Shaw, S.1994. Leukocyte Differentiation Antigen Database [database]. Version 1.11 [5th International Workshop on Human Leukocyte Differentitation Antigens. Available from Stephen Shaw, National Institutes of Health, on disk; NIH ftp site（balrog.nci.nih.gov）, Bethesda, MD].
19. Reinherz EL, Hussey RE, Fitzgerald K, Snow P, Terhorst C and Schlossman SF. 1981. Antibody directed at a surface structure inhibits cytolytic but not suppressor function of human T lymphocytes. Nature 294:168-170.
20. Caligiuri M, Murray C, Buchwald D, Levine H, Cheney P, Peterson D, Komaroff AL and Ritz J. 1987. Phenotypic and functional deficiency of natural killer cells in patients with chronic fatigue syndrome. J Immunol. 139:3306-3313.
21. Benjamini E and Leskowitz S. Immunology: A Short Course. Second Edition. 1991. New York: Wiley-Liss, pp. 211-244.
22. Reinherz EL, O'Brien C, Rosenthal P and Schlossman SF. 1980. The cellular basis for viral-induced immunodeficiency: Analysis by monoclonal antibodies. J Immunol 125:1269-1274.
23. Felsenstein D, Carney WP, Iacoviello VR and Hirsch MS. 1985.
Phenotypic properties of atypical lymphocytes in cytomegalovirus-induced mononucleosis. J Infect Dis 152:198-203.
24. Rinaldo CR, Ho M, Hamoudi WH, Gui X and DeBiasio RL. 1983. Lymphocyte subsets and natural killer cell responses during cytomegalovirus mononucleosis. Infect Immun 40:472-477.
25. Goldstein G, Lifter J and Mittler R. Immunoregulatory changes in human disease detected by monoclonal antibodies to T lymphocytes. In: Monoclonal Antibodies in Clinical Medicine. McMichael AJ and Fabre JW, eds. 1982. New York, NY: Academic Press, pp. 39-70.
26. Pedrazzini A, Freedman AS, Andersen J, Heflin L, Anderson K, Takvorian T, Canellos GP, Whitman J, Coral F, Ritz J and Nadler LM. 1989. Anti-B cell monoclonal antibody purged autologous bone marrow transplantation for B-cell on-Hodgkin's lymphoma: Phenotypic reconstitution and B-cell function. Blood 74:2203-2211.
27. Preijers FWMB, DeWitte T, Wessels JMC, DeGast GC, VanLeeuwen E, Capel PJA and Haanen C. 1989. Autologous transplantation of bone marrow purged in vitro with anti-CD7-（WTI-）Ricin A Immunotoxin in Tcell lymphoblastic leukemia and lymphoma. Blood 74:1152-1158.
28. Ramos EL, Turka LA, Leggat JE, Wood IG, Milford EL and Carpenter CB. 1989. Decrease in phenotypically defined T helper inducer cells（T4+4B4+）and increase in T suppressor effector cells（T8+2H4+）in stable renal allograft recipients. Transplantation 47:465-471.
29. Fauci AS. 1988. The human deficiency virus: Infectivity and mechanism of pathogenesis. Science 239:617-622.
30. Taylor MGJ, Fahey JL, Detels R and Giorgi JV. 1989. CD4 percentage, CD4 number and CD4:CD8 ratio in HIV infection: How to choose and how to use. J AIDS 2:114-124.
31. Beverley PCL and Callard RE. 1981. Distinctive functional characteristics of human T lymphocytes defined by E rosetting or a monoclonal anti-T cells antibody. Eur J Immunol 1:329-334.
32. Reinherz EL, Kung, PC, Goldstein G and Schlossman SF.1979. A monoclonal antibody with selective reactivity with functionally mature human thymocytes and all peripheral human T cells. J Immunol 123:1312-1317.
33. National Committee for Clinical Laboratory Standards. 1991. Procedures for the Collection of Diagnostic Blood Specimens by Venipuncture. 3rd Edition（H3-A3）. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Villanova, PA.
34. Loken MR, Brosnan JM, Bach BA and Ault KA. 1990. Establishing optimal lymphocyte gates for immunophenotyping by flow cytometry. Cytometry 11:453-459.
35. Gebel HM, Lebeck LL, Jensik SC, Landay AL and Bray RA. 1989. Discordant expression of CD3 and T cell receptor antigens on lymphocytes from patients treated with OKT3. Transplantation Proceedings 1:1745-1746.
36. Tunnacliffe A, Olsson C, Traunecker A, Krissensen GW, Karjalainen K and De Le Hera A. The majority of CD3 epitopes are conferred by the epsilon chain. In Leukocyte Typing IV, White Cell Differentiation Antigens. Knapp W, Dorken B, Gilks WR, Rieber EP, Schmidt RE, Stein H and Kr. von dem Borne AEG, eds. 1989. Oxford: Oxford University Press, pp. 295-296.
37. Schroeder TI and Chatenoud L: Immunological monitoring during treatment with OKT3. Presented under the auspices of the American Society of Transplant Surgeons.
38. Koepke JA and Landay AL. 1989. Precision and accuracy of absolute lymphocyte counts. Clin Immunol Immunopathol 52:19-27.

****問い合わせ先**

ベックマン・コールター株式会社

〒135-0063　東京都江東区有明三丁目５番７号　TOC 有明ウエストタワー

TEL：0120-566-730　　FAX：03-5530-2460

****製造販売元**

ベックマン・コールター株式会社

〒135-0063　東京都江東区有明三丁目５番７号　TOC 有明ウエストタワー

6607053_0911